

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI *Pseudomonas* DARITANAH KEBUN BIOLOGI WAMENA DAN UJI AWAL SEBAGAI AGEN BIOKONTROL *Fusarium*

[The Isolation and Identification of *Pseudomonas* from
The Wamena Biological Gardens Soil and Its Preliminary Test as
Biocontrol Agent on *Fusarium*]

HJD Latupapua dan NNurhidayat

Bidang Mikrobiologi, Puslit. Biologi- LIPI

ABSTRACT

Pseudomonas bacteria plays essential role in soil ecology such as decomposer and biological control. The bacteria were isolated on selective media and identified from five soil samples taken within area of Wamena Biological Gardens. There are six species *Pseudomonas* were identified based on morphological characters and biochemical reaction. *P. striata* was found to be common in soil of the area. No pathogen *Pseudomonas* was identified in all soil samples. Preliminary study on biological control for fungal pathogen *Fusarium* indicated that *P. fluorescens*, *P. striata* and *P. cepacia* have ability to inhibit *Fusarium* growth in vitro.

Kata kunci/ Keywords: Isolasi/isolation, identifikasi/identification, Kebun Biologi Wamena/The Wamena Biological Gardens, *Pseudomonas*, *Fusarium*, Biokontrol/Biocontrol.

PENDAHULUAN

Sebagai unsur biotik, ternyata aneka jenis tumbuhan, binatang dan mikroba berperan dalam pengembangan ciri suatu ekosistem. Mikroba tanah merupakan salah satu bagian penting yang berperan dalam dinamika interaksi unsur biotik. Banyak jenis mikroba tanah telah dicacah dan diidentifikasi potensinya. Salah satu jenis ini adalah *Pseudomonas*. Perannya dapat berakibat negatif maupun positif. Jenis bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* diketahui sebagai penyebab penyakit pada tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum*) (Gitaitis et al., 1985). Penyakit pada tanaman tersebut dapat pula disebabkan oleh *P. syringae* pv. *tomato* (Bonn et al., 1985, Fackrell dan Sinha, 1985, Getz et al., 1983). Infeksi bakteri ini dapat mengakibatkan produksi berkurang, kematangan buah tertunda dan kualitas buah berkurang karena terjadi bercak pada kulit buah (Getze et al., 1983). Namun beberapa jenis *Pseudomonas* memiliki kemampuan antagonis terhadap pertumbuhan mikroba lainnya. Selain bakteri, juga dikenal jamur sebagai agen patogen tanaman. Jamur *Fusarium* spp. diketahui sebagai penyebab penyakit busuk akar pada tanaman pisang (Wardlaw, 1961) dan tomat (Sivan dan Chet, 1993). *Fusarium moniliforme*

sebagai penyebab busuk batang dan bercak daun pada tanaman jagung (Styer dan Cantliffe, 1984).

Hingga saat ini, pengembangan pertanian di Kabupaten Jayawijaya belum mengenal cara pengendalian hama penyakit secara kimiawi. Juga kasus gangguan penyakit pada tanaman secara mencolok belum ditemukan. Walaupun demikian perkembangan laju pembangunan di kawasan ini makin cepat sehingga dapat berpengaruh pada ekosistem asli kawasan ini. Perubahan ekosistem ini akan terjadi juga pada perkembangan aneka jenis mikroba non-patogen maupun patogen. Proses perubahan ekosistem ini memungkinkan dapat terjadi ledakan pertumbuhan mikroba patogen tanaman sehingga diperlukan upaya pengendaliannya.

Berkaitan dengan ini, biokontrol akan menjadi bagian penting dalam sistem pertanian di daerah ini. Pertimbangan lainnya adalah karena adanya kecenderungan konsumen pada akhir-akhir ini lebih memilih produk pertanian yang alamiah, bebas residu bahan kimia dan ramah lingkungan. Dalam hal ini, penggunaan pestisida berbasis bahan kimia sintesis tidak lagi menjadi primadona, makin kurang populer karena selain berbahaya bagi kesehatan manusia juga dapat berdampak negatif bagi kualitas lingkungan.

Belum banyak informasi mikrobiologis tanah dari Kebun Biologi Wamena, Papua. Sampai saat ini belum ada data yang mengungkapkan keberadaan *Pseudomonas* dan peran ekologisnya dalam tanah di kebun ini. Sementara ini, sejumlah jenis bakteri telah diketahui memiliki peran ekologis penting yang berpotensi ekonomis yaitu sebagai agen biokontrol jamur patogen pada tanaman.

Dari penampakan jenis tanah, Kebun Biologi Wamena memiliki keunikan ragam jenis tanah. Beberapa bagian lahan memiliki tanah berwarna antara lain hitam, coklat, merah, merah-kuning dan kuning. Keunikan dan keragaman jenis tanah termaksud dapatkah mencerminkan keunikan dan keragaman jenis mikroba yang hidup di dalamnya.

Penelitian pendahuluan ini bertujuan untuk mengungkapkan keanekaragaman spesies *Pseudomonas* dari ragam sejumlah jenis tanah di Kebun Biologi Wamena dan potensinya sebagai agen biokontrol jamur patogen.

BAHAN DAN CARA KERJA

Tanah contoh (*soil sample*) diambil secara acak di beberapa bagian Kebun Biologi Wamena berdasarkan warna tanah dan kondisi vegetasi pada kedalaman 0 sampai 15 cm tanggal 25 Oktober 2000. Tanah dimasukkan ke dalam kantung-kantung plastik hitam kemudian segera dibawa ke Bogor dan disimpan di lemari pendingin hingga penelitian dilakukan.

Sepuluh gram tanah contoh dihomogenasikan dalam 500 ml larutan 0,25% sodium pirofosfat selama

30 menit. Satu ml suspensi yang terbentuk kemudian diencerkan hingga 10^{-4} dan disebarkan merata pada medium selektif *Difco Pseudomonas Isolation Agar* yang dibuat sesuai petunjuk pabrik pembuatnya. Bakteri kemudian ditumbuhkan pada kondisi suhu kamar selama 48 jam. Koloni yang terbentuk kemudian diseleksi dan diidentifikasi.

Konfirmasi dan identifikasi jenis *Pseudomonas* dilakukan melalui serangkaian pengamatan morfologis dan reaksi biokimia konvensional yang mengacu pada metoda standar Bergey.

Uji pendahuluan untuk mengetahui potensi isolat *Pseudomonas* dilakukan dengan menumbuhkannya pada media agar nutrisi yang diperkaya dengan 10 % ekstrak tanah asal Wamena yang telah disebarkan suspensi jamur *Fusarium*. Potensi kualitatif ditentukan dengan menentukan skor positif untuk isolat yang menunjukkan penghambatan pertumbuhan jamur uji dan negatif untuk keadaan sebaliknya.

Analisis C, N, P dan K yang terkandung di tanah dilakukan di Laboratorium Tanah Institut Pertanian Bogor. (Tabel 1)

HASIL

Hasil isolasi *Pseudomonas* dari lima macam tanah Kebun Biologi Wamena serta kepadatan populasinya dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil uji in vitro daya penghambat pertumbuhan jamur *Fusarium* oleh bakteri *Pseudomonas* tampaknya bervariasi seperti tertera pada Tabel 3.

Tabel 2. Jumlah populasi *Pseudomonas* dan spesies teridentifikasi dari tanah Kebun Biologi Wamena.

Tanah	Jumlah <i>Pseudomonas</i> (CFXJ/gram)	Spesies
Merah	$5,00 \times 10^3$	<i>P. arvilla</i> , <i>P. oleovorans</i>
Kuning	$3,60 \times 10^4$	<i>P. fluorescens</i> , <i>P. striata</i> , <i>P. putida</i>
Coklat Kuning	$8,50 \times 10^4$	<i>P. putida</i> , <i>P. arvilla</i> , <i>P. striata</i>
Coklat	$1,32 \times 10^5$	<i>P. striata</i> , <i>P. cepacia</i>
Wiep	$1,46 \times 10^5$	<i>P. striata</i>

Tabel 3. Hasil uji kualitatif penghambatan pertumbuhan *in vitro* *Fusarium* spp. oleh isolat *Pseudomonas*

Tanah Conto dan Isolat <i>Pseudomonas</i>		Penghambatan Pertumbuhan <i>Fusarium</i> spp
Merah:	<i>P. arvilla</i>	-
	<i>P. oleovorans</i>	-
Kuning:	<i>P. fluorescens</i>	+
	<i>P. striata</i>	+
	<i>P. putida</i>	-
Coklat Kuning:	<i>P. putida</i>	-
	<i>P. arvilla</i>	-
	<i>P. striata</i>	+
Coklat:	<i>P. striata</i>	+
	<i>P. cepacia</i>	+
Wiep:	<i>P. striata</i>	+

Tabel 1. Kandungan hara utama tanah Kebun Biologi Wamena.

Tanah	Kandungan Hara Utama			
	C %	N %	P ppm	K me/100g
Merah	0,62	0,06	0,3	0,07
Kuning	0,51	0,05	0,4	0,005
Coklat Kuning	0,69	0,06	0,2	0,07
Coklat	2,47	0,23	2,7	0,10
Wiep	3,05	0,30	3,9	0,36

PEMBAHASAN

Jenis-jenis *Pseudomonas* yang diisolasi dari sejumlah tanah berasal dari Kebun Biologi Wamena mempertegaskan bahwa tanah di kawasan ini belum mengalami kontaminasi dari bakteri patogen tanaman marga ini. Dari enam jenis *Pseudomonas* yang berhasil diisolasi ternyata tergolong bakteri non-patogen seperti tertera pada Tabel 2. Telah diketahui kemampuan *P. putida* menghambat pertumbuhan mikroba patogen *Erwinia* spp. (Colyer dan Mount, 1984).

Data pada Tabel 2, juga memperlihatkan bahwa jumlah *Pseudomonas* terisolasi dari tanah cerah (merah, kuning dan coklat-kuning) lebih rendah dari pada tanah gelap (wiep dan coklat). Tanah berwarna gelap dapat mengandung jumlah bahan organik lebih

banyak dari pada tanah yang cerah. Hasil analisis kandungan kimia di Laboratorium Ilmu Tanah Institut Pertanian Bogor (IPB) memperlihatkan bahwa tanah berwarna gelap, kehitaman yang ditumbuhi wiep (*Grevillea papuana*) serta tanah coklat yang ditumbuhi alang-alang (*Imperata cylindrica*) mengandung C lebih banyak dari tanah berwarna kuning yang ditumbuhi alang-alang. Seperti tertera pada Tabel 1, tanah di bawah tegakan wiep dan yang berwarna coklat mengandung C masing-masing sebanyak 3,05% dan 2,47% sedangkan tanah kuning mengandung C sebanyak 0,51% . Juga hasil analisis N P dan K memperlihatkan keadaan serupa. Kandungan N di tanah wiep, coklat dan tanah kuning masing-masing 0,30%, 0,23% dan 0,05%, kandungan P masing-masing 3,9 ppm, 2,7 ppm dan 0,4 ppm serta kandungan

K masing-masing 0,36 me/100 g, 0,10 me/100 g dan 0,05 me/100 g. Berdasarkan hasil analisis tanah ini, tampak bahwa kandungan C, N, P dan K yang tinggi menciptakan populasi *Pseudomonas* yang tinggi pula.

Hasil isolasi seperti tertera pada Tabel 2 dan 3, ternyata tanah berwarna cerah (kuning dan coklat kuning) menunjukkan keragaman jenis *Pseudomonas* lebih tinggi dari pada tanah berwarna gelap (tanah wiep). Kenyataan ini diduga ada kaitannya dengan kandungan unsur mikro.

Pseudomonas striata dijumpai di hampir semua tanah sehingga dapat dikatakan sebagai spesies yang umum terdapat di Kebun Biologi Wamena. Spesies ini bersama *P. fluorescens* dan *P. cepacia* merupakan spesies umum terdapat pada tanah-tanah daerah tropis yang kaya nutrisi (Lim, 1998).

Pada Tabel 2 memperlihatkan bahwa beberapa isolat *Pseudomonas* teridentifikasi menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan secara *in vitro* pada jamur patogen *Fusarium* spp. Isolat *P. fluorescens*, *P. striata* dan *P. cepacia* menunjukkan kemampuan menghambat pertumbuhan jamur uji yang menunjukkan potensinya sebagai agen biokontrol jamur patogen tersebut. Tiga jenis *Pseudomonas* lain termasuk *P. putida* yang diuji tidak memperlihatkan kemampuan menghambat jamur *Fusarium* ini. Walaupun demikian pada hasil penelitian Dupler dan Baker (1984), ternyata *P. putida* mampu menekan pertumbuhan jamur *Fusarium*. Akurasi perbedaan respon ini umumnya hanya dapat terlihat jelas pada tingkat strain. *Pseudomonas fluorescens* dan *P. putida* tergolong bakteri yang agresif, epifit, tumbuh cepat membentuk koloni di perakaran tanaman, juga merupakan bakteri perangsang pertumbuhan tanaman (Aspiras dan de la Cruz, 1986). Hasil uji pemanfaatannya dalam pertanaman kentang ternyata pemberian dua jenis bakteri ini mampu meningkatkan hasil kentang pada plot percobaan di California dan Idaho berkisar antara 5 hingga 33 % (Kloepper *et al*, dalam Aspiras dan de la Cruz, 1986). Juga terjadi peningkatan hasil umbi bit antara 4 hingga 8 ton per ha dengan peningkatan gula berkisar antara 955 hingga 1227 kg. per ha

(Suslow dan Schroth dalam Aspiras dan de la Cruz, 1986).

Penghambatan pertumbuhan ini dapat merupakan mekanisme persaingan dimana bakteri lebih cepat tumbuh kemudian mengeluarkan metabolit yang menghambat pertumbuhan jamur. Pernyataan ini seperti dikemukakan oleh Mazzola *et al* (1995) bahwa beberapa jenis antibiotik seperti agrocin, herbicilin, oomycin A, phenazines, pyoluteorin telah diketahui dapat diproduksi *Pseudomonas* untuk menekan pertumbuhan jamur patogen. Bahan anti jamur phenazine-1-carboxylic acid (PCA) dan 2,4-diacetylphloroglucinol (Phi) yang diproduksi oleh *Pseudomonas fluorescens* telah dikarakterisasi dan digunakan sebagai agen biokontrol. Dengan demikian selain menghasilkan bahan anti jamur, dan dapat tumbuh cepat serta agresif maka bakteri *P. fluorescens* memiliki kemampuan bersaing dengan mikroba patogen seperti jamur *Fusarium* maupun bakteri patogen *P. solanacearum*.

Mekanisme lainnya yang ditunjukkan *P. fluorescens* adalah dengan mensekresikan suatu siderofore pseudobactin yang diproduksi dalam keadaan ion ferric (FeIII) yang terbatas (Glick dan Pasternak, 1994). Keterbatasan ion besi ini pada gilirannya akan membatasi pertumbuhan jamur patogen. Ion besi ini kemudian oleh beberapa tanaman dapat diambil untuk kepentingan pertumbuhannya. Namun jamur itu sendiri telah dikenal memproduksi bahan antibakteri sebagai respon terhadap persaingan tersebut. Dalam hal ini, isolat bakteri mampu menghambat pertumbuhan jamur patogen sehingga menekan jumlah bahan antibakteri yang dihasilkan. Cook dan Baker dalam Chen *et al*, (1995) mengemukakan bahwa beberapa mekanisme mikroba endofit yang mampu mengendalikan pertumbuhan jamur patogen *Fusarium* antara lain adanya bahan senyawa anti jamur dan siderofore yang dihasilkan, kemampuan persaingan nutrisi, relung yang sesuai dan adanya sistem resistensi.

Data ini menunjukkan bahwa keanekaragaman jenis *Pseudomonas* non patogen di tanah Kebun Biologi Wamena merupakan suatu aset yang perlu dikembangkan secara berkelanjutan. Keadaan

ekosistem tanah yang alamiah **dan** masih stabil merupakan sumber mikroba yang dapat dimanfaatkan untuk industri yang tidak merusak lingkungan antara lain sebagai agen biokontrol penyakit tanaman.

KESIMPULAN

Isolasi *Pseudomonas* dari tanah asal Kebun Biologi Wamena diperoleh enam jenis yang non patogen, *Pseudomonas striata* dijumpai hampir di seluruh tanah dan tiga jenis lainnya yaitu *P. cepacia*, *P. fluorescens* dan *P. striata* berpotensi sebagai agen biokontrol jamur patogen *Fusarium*.

Penelitian lanjutan yang mengkarakterisasi bakteri *Pseudomonas* perlu dilakukan untuk lebih mengungkapkan ciri spesifik kelompok mikroba ini sebagai agen biokontrol dan perangsang pertumbuhan tanaman serta perannya secara khusus dalam ekosistem di tanah Kebun Biologi Wamena.

DAFTAR PUSTAKA

- Aspiras RB and AR de la Cruz. 1986.** Potential Biological Control of Bacterial Wilt in Tomato and Potato With *Bacillus polymyxa* FU6 and *Pseudomonas fluorescens* in G.J. Blair DA, Ivory and TR Evans (Eds.). *Forages in Southeast Asian and South Pasific Agriculture. Proceedings of International Workshop*, 89-92.
- Bonn WG, RD Gitaitis and BH MacNeil. 1985.** Epiphytic Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on Tomato Transplants Shipped from Georgia. *Plant Disease* 6 (1), 58-60.
- Chen C, EM Bauske, G Musson, RR Kabana and W. J. Kloepper. 1995.** Biological Control of *Fusarium* Wilt on Cotton by Use of Endophytic Bacteria. *Biological Control* 5, 83-91.
- Colyer PD and MS Mount. 1984.** Bacterization of Potatoes with *Pseudomonas putida* and Its Influence on Postharvest Soft Rot Diseases. *Plant Disease* 68 (81), 703-706
- Dupler M and R Baker. 1984.** Survival of *Pseudomonas putida*, a Biological Control Agent in Soil. *Phytopathology*.
- Fackrell HB and RC Sinha. 1983.** Serological Analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Phytopathology* 73 (2), 178-181.
- Getz S, CT Stephens and DW Fulbright. 1983.** Influence of Development Stage on Susceptibility of Tomato Fruit to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Phytopathology* 71 (1), 36-38.
- Gitaitis RD, JB Jones, CA Jaworski and SC Phatak. 1985.** Incidence and Development of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on Tomato Transplants in Georgia. *Plant Disease* 69 (1), 32-35.
- Glick, R Bernard and JJ Pasternak. 1994.** *Molecular Biotechnology: Principles and Application of Recombinant DNA*. ASM Press, Washington, DC.
- Lim D. 1998.** *Microbiology*. Second Edition. WBC. McGraw-Hill, Boston.
- Mazzola M, DK Fujimoto, LS Thomashow and RJ Cook. 1995.** Variation in Sensitivity of *Gaeumannomyces graminis* to Antibiotics Produced by Fluorescent *Pseudomonas* spp. and Effect on Biological Control of Take All of Wheat. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (7), 2554-2559.
- Sivan A and I Chet. 1993.** Integrated Control of *Fusarium* Crown and Root Rot of Tomato with *Trichoderma harzianum* in Combination with Methyl Bromide or Soil Solarization. *Crop Protection*, 12 (5), 380-386.
- Styer RC and DJ Cantliffe. 1984.** Infection of Two Endosperm of Sweet Corn by *Fusarium moniliforme* and Its Effect on Seedling Vigor. *Phytopathology* 74 (2), 189-194.
- Wardlaw CW. 1961.** *Banana Diseases, Including Plantains and Abaca*. Longmans.